BIO-RAD
Nippon
Bio-Rad Laboratories 1998 MAY
Application News

目　次

プロテオーム研究における二次元電気泳動法及び Melanie II ソフトウェアの有用性

順天堂大学医学部中央機器分析室　進藤典子　村山季美枝

ゲノムからプロテオーム研究への流れ

1986年に始まった、高等生物であるヒトのゲノム解析は当初の予定である2005年を大幅に上回って完了しそうである。一方、1995年のヘモフィラス インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）の全DNA解読を皮切りに、大腸菌やらん藻等５種類のDNA解読も終了した。これらを含めると、1997年３月現在で50種類の細菌のゲノム解析が国際的な協力体制の元に実施されている。ゲノム時代は、一挙に開花した感がある。これはゲノム解析に対する人々の期待が如何に大きいかの反映でもある。然し、ゲノムの機能はその遺伝子配列情報のみで決定する事はできない。一つの遺伝子が造り出す蛋白質はスプライシングの程度と翻訳後修飾の種類（プロセッシング、リン酸化、糖化、メチル化、N-、C-末の修飾）によって何種類にも及ぶことがある。これ以外にも①発生や分化のある特定の時期にのみ発現する蛋白質、②正常成分である蛋白質が、何時、どのくらいの量の遺伝子から翻訳されるか、③薬物、加齢、疾患により発現する蛋白質の同定等の各種蛋白質の変化をゲノムのDNA配列情報から予測することは困難である。

ゲノムが明らかになった細胞や組織においては、ゲノム情報を発現する蛋白質を同定しその機能を明らかにする段階に至っている(1)。細胞や組織単位で存在する何千という蛋白質を鳥瞰図としてデーターベース化し、生命現象の変化に関わる蛋白質を的確にとらえてゲノムとの関連を明らかにしようとする動きが1994年、オーストラリアのマッカリー大学ウイリアムス教授等により始められた。オーストラリア政府は国をあげてその研究を支援した。当時大学院生であったウイルキンスがゲノムを反映した蛋白質を表現する為に“Proteome (Protein＋Genome)”という造語を世に送り出した。その後彼はジュネーブ大学に移り、精力的にこの分野の研究を進めている。

これを機にプロテオーム研究がヨーロッパを中心に急速に拡がっていった。そこでの基本手法は、次の通りである。①ある状況下の細胞或いは臓器における全蛋白質分布の鳥瞰図を得る。②焦点となる蛋白質スポットがデーターベース上の既知の蛋白質であるか否かをDNAの情報を含めて検索する。③未知蛋白質の場合はその蛋白質の構造および機能を明らかにする。将来的には全てのスポットを同定し、完全な鳥瞰図マップの作製をめざしている。生理的な環境変化で、このマップ上のある蛋白質の量或いは質の変化を観察し、最終的にその蛋白質の機能を明らかにすることを目的としている。

二次元電気泳動法の開発

この鳥瞰図マップを作製する手法として蛋白質の二次元電気泳動法（2-D PAGE : Two dimensional polyacryl-

amide gel electrophoresis）が利用された。これは20年以上前に開発された手法であるが、蛋白質をその等電点と分子量の大きさにより分離する分解能の高い分離分析手段である。2-D PAGEにおける一次元分析の等電点電気泳動には伝統的なキャリアアンフォライトが用いられている。一般にキャリアアンフォライトはpH勾配の再現性に問題があり、２枚のゲルを比較検討するためには習熟した技術が求められた。

1980年代になりpHを固定化した“Immobilized pH Gradient gel”(IPG gel)が開発され、pH勾配の再現性が大幅に改善された。その結果、２枚のゲル比較が格段に容易になった。その上、ゲルのpH範囲（pH3-12）や試料負荷量（1-15mg）も近年になって著しく改良され、市販されるようになった為に、適用範囲も拡がった。現在16cm×18cmのポリアクリルアミドゲル上で3000個に及ぶ蛋白質をスポットとして分離する事が可能となった。その結果IPGゲルのプロテオーム研究に果たす役割は著しく上昇した。実際にHsich等は、このIPGゲルを使い、Creuzfeldt-Jakob病（狂牛病）患者の脊髄液中に正常人には存在しない二つの蛋白質スポット130と131とを見つけ、これらが本来、脳内蛋白質として知られている14-3-3 (protein kinase C inhibitor protein-1)であることを証明した。従来生前診断法がなかったこの疾患の指標になることを示した(2)。

この様な2-D PAGE像はスキャナーやCCDカメラ等を使った市販の装置によりデジタル化された後に解析される。IPGゲルの開発により再現性が向上したとはいえ、２枚の2-D PAGE像をそのまま合致させるほど完全な再現性は得られない。そこで、このデジタル化されたイメージを使ってわずかなゲルの歪みをゲル中の適当な指標を利用してコンピュータで補正する。その結果、スポットの位置、量変化、pI、MW (Dalton)に関する信頼性の高いデータが得られるようになった。

スポット同定を行うに際して注意すべき事は、標準ゲルと同一条件（試料の処理、ゲル、及び泳動条件）の試料ゲルを作製することである。これらに関しては文献、或いはExPASy (Expert Protein Analysis System)の中にプロトコールとして示されている（http://exspacy.hcuge.ch.ch2d/technicalinfo.html)。

蛋白質スポット解析における Melanie II ソフトウェアの役割

Melanie IIは1991年ジュネーブ大学のRon D. Appel等がプロテイン解析の為に開発した。試料のゲルイメージを既にスポットが同定されている標準ゲルイメージと比較することができるソフトウェアは各社のイメージアナライザーにインストールされているが、Bio-Rad社のMelanie IIもその一つである。図1-Aに示すごとくMelanie IIソフトウェアにあるMelViewまたはMelBatchのコマンドを用いて各研究者が独自の研究分野のデーターを比較し保存することができる。

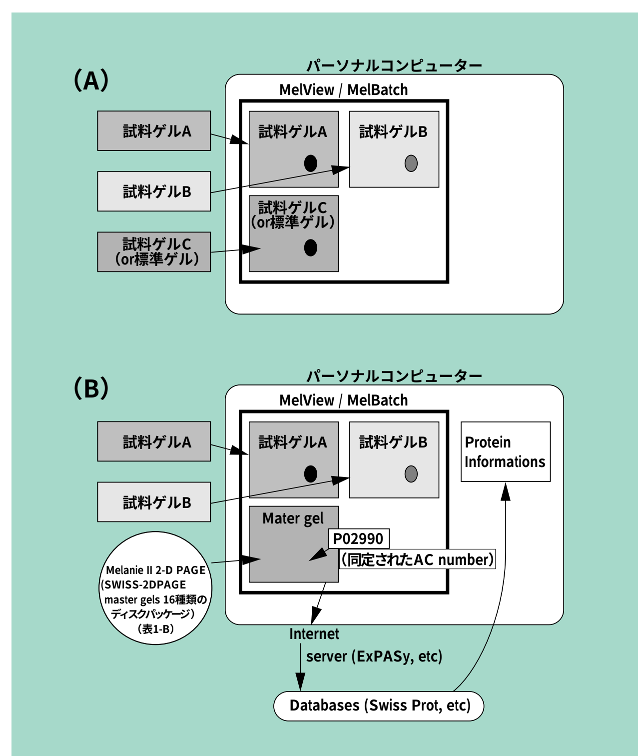


図1. Malanie IIソフトウェア概念図

これとは別に、図1-Bに示すMelanie II独自の使用法がある。現在、世界のどこからでもインターネットを使ってアクセスすることが可能な人細胞及び臓器或いは微生物等の標準ゲルの2-D PAGE像のデータベース化が進んでおり、表1-Aに示す19個のデーターベースサイトが存在している。

Melanie IIはこの中のSWISS-2D PAGE（☆印）の16種のマスターゲルイメージ（表1-B）を収録したディスクパッケージ（version 2.2）を有しており、MelViewを介してそれらの標準ゲルの2-D PAGE 像と同一条件で分析した手持ちのゲルを比較することができる。その結果、一致したスポットの蛋白質情報を得るためにインターネットを用い{ExPASy (http://exspasy.hcuge.ch/)等}上記データーベースサイトに直接アクセスすることができる(3)。蛋白質名はSWISS-PROTのAC (Accession number)か、略称で表示されている（図2.)。

プロテオーム研究の主旨から未同定スポットは相当の早さで同定されていくであろうと思われる。又標準となるゲルの種類も急速に増加することが予測される。これに合わせて既に使用しているマスターゲル情報を更新していかなければならない。これらのデータの更新、追加はインターネット経由で簡単に出来ると言われている(4)。しかしながら、蛋白質の情報量が多い為に通常のパソコンでは実行できず、Solarisの作業環境下で動く Sun Microsystems Workstationsを用いる必要がある。一方、現在のMelanie IIのソフトプログラムはパソコンで使用出来る利便性はあるが、マスターゲルの更新はメーカーのversion upを待たなければならない。

現在はその他のインターネットによる蛋白質解析方法として NCI-Flicker (http://www-lecb.ncifcrf.gov/flicker/)(5)が

報告されているが、インターネットを長時間占有する不便さ、或いはコンピューターの性能等の問題があり、現実には解析の検討を行っていない。

以上プロテオーム研究における二次元電気泳動法及びMelanie IIのソフトウェアの有用性について記したが、日本におけるこの分野の研究は緒についたばかりである。World wideの比較がどの程度可能であるかは研究者が作製する試料ゲルが標準ゲルに近いものであるか否か、またMelanie IIソフトウェアの使いやすさやデータ更新の容易さが鍵となるであろう。

文献

(1) *"Proteome Research : New Frontiers in Functional Genomics"*, 1997, edited by D. F. Hochstrasser, Springer-Verlag Berlin

(2) HsichG, et al. *N. Engl. J. Med*, 1996, **335**, 824-930

(3) Appel, RD, et al. *Electrophoresis,* 1997, **18**, 2724-2734

(4) Hooglnd C., et al. *Electrophoresis,* 1997, **18**, 2755-2758

(5) Lemkin, P. F., *Electrophoresis*, 1997, **18**, 2759-2773

表1-A　2-D PAGEデータベース

WORLD-2DPAGE
http://www.expasy.ch/ch2d/2d-index.html

☆SWISS-2DPAGE
http://www.expasy.ch/ch2d/ch2d-top.html

YPM
http://www.ibgc.u-bordeaux2.fr/YPM

YEAST 2D-PAGE
http://yeast-2dpage.gmm.gu.se/

ECO2DBASE
http://pcsf.brcf.med.umich.edu/edu/eco2dbase

Sub2D
http://pc13mi/biologie.unipgreifswald.de/

Cyano2Dbase
http://www.kazusa.or.jp/tech/sazuka/cyano/proteome.html

Aberdeen 2-D db
http://www.abdn.ac.uk/~mmb023/2dhome.htm

Maise 2-D db
http://moulon.moulon.inra.fr/imgd/

Fly 2-D db
http://tyr.cmb.ki.se/

LSB 2-D db
http://www.lsbc.com/2dmaps/patterns.htm

HSC-2DPAGE
http://www.harefield.nthames.nhs.uk/nhli/protein/

HEART-2DPAGE
http://www.chemie.fu-berlin.de/user/pleiss/dhzb.html

HP-2DPAGE
http://www.mdc-berlin.de/!emu/heart/

Danish 2-D db
http://www.biobase.dk/cgi-bin/celis

Emb.stem cell
http://www.ed.ac.uk/~nh/2DPAGE.html

A375 UCSF 2-D
http://rafael.ucsf.edu/2DPAGEhome.html

ANGL Breast 2-D
http://www.anl.gov/CMB/PMG/projects/index_hbreast.html

Colon carcinoma
http://www.ludwig.edu.au/www/jpsl/jpslhome.html

文献1 pp.127 Table 5.1より抜粋

☆表1-B　SWISS-2DPAGE map (version 2.2)

Human biological map
1. Colorectal-epithelia-cells
2. Cerebrospinal-Fluid
3. Erythroleukemia-Cell
4. H epG2
5. HepG2-secreted proteins
6. Human-promyelocytic-leukemia-cells
7. Liver
8. Kidney
9. Lymphoma
10. Plasma
11. Platelet
12. Red-blood-cells
13. Macrophage-like-cell-line

Others
14. Dictyostelium-discoideum
15. E.coli
16. Yeast

(Sanchez etal. 1995; *Electrophoresis* **16**, 1131-1151, Appel et al. 1996: *Nucleic Acids Res.*, **24**, 180-181)

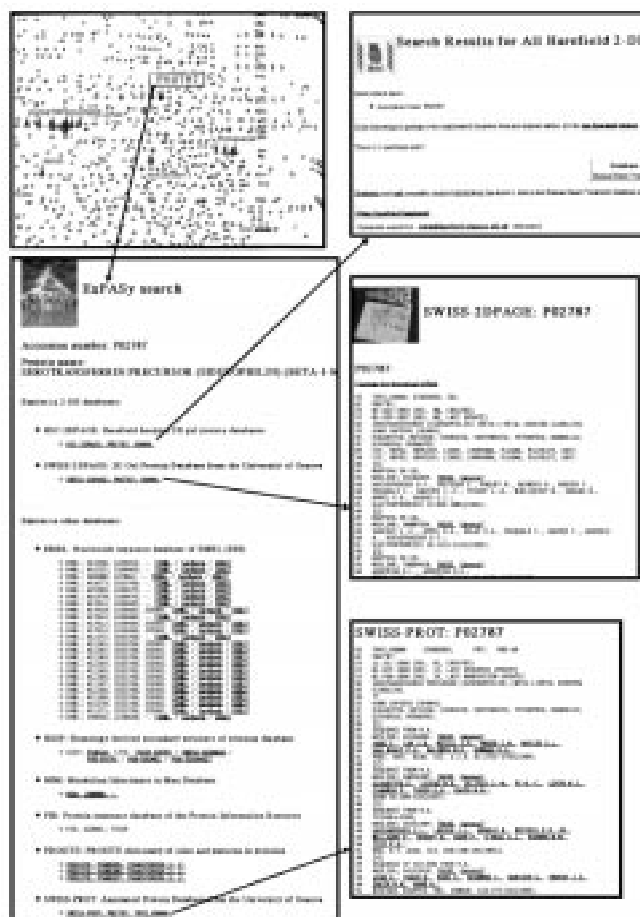


図2. 固定されたスポットの種々のデータベース情報

パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による感染症の分子疫学的解析のTips

横浜市立大学医学部小児科・臨床検査部　満田年宏

はじめに

開発以来、主に染色体遺伝子のサブクローニング技術に使われてきたパルスフィールドゲル電気泳動法は、1990年代に入ると遺伝的多型性解析（PFGE-RFLPs）の一手法としての可能性が研究され始めた。そして応用範囲がMRSAの院内感染ルートの解明に応用され始めると[1]、その後は適応菌種を着実に増やし、現在では培養可能なほとんどの臨床細菌において報告がなされている。これら膨大なデーターの蓄積により、今日では多型性解析のgolden standardとして、ことに新興・再興感染症分野で実践的に使われてきている。PFGEは、1996年、我が国でおこったVero毒素産生性腸管出血性大腸菌O157：H7の集団感染の多発に際し"遺伝子型別判定法"として、間接的ではあるがその存在は全国民に知れ渡ることとなった。著者はこの頃、耐熱性毒素産生性毒素原性大腸菌O25：NMの800人を越える集団感染事例の解析に明け暮れていた[2]。今日、Internetを介し全世界の感染症疫学研究者が、リアルタイムで種々の感染症の集団感染の事例を報告することで、短期間に全世界的な感染源追求のための調査が遂行できるようになりつつある。なんと、mass productionとして一般消費者に出荷された食品や生物を媒介して、全世界的な規模で集団発生が起こっていることが解ってきたのだ。たとえばアルファルファモヤシを介しての、サルモネラ感染症の報告事例がある。このケースでは菌は種子からは検出されなかったが、世界各地での喫食調査において、アルファルファモヤシが共通食材として残り、さらに患者は国は違えども同じ種子会社の生産した種子をもとに栽培されたモヤシを喫食していたのである[3]。そして、PFGE-RFLPsの結果もそれを裏付けていた。このように、交通手段の加速している現代では、従来の待っている検疫体制ではもはや限界である。個々の国を集団感染から防衛するには国際協力が必須である点で、米国疾病対策センターCenters for Disease Contorol and Prevention (CDC)も世界保健機構WHOも認識が一致している。以下、PFGE-RFLPsによる疫学解析法施行時の注意事項とtipsを以下項目別に述べることにする。

汚染対策

まず対象とする検体が、感染性微生物であるである点を改めて認識して欲しい。それぞれの菌種に対し、一般的な取り扱いに関するバイオハザードレベルはCDCの基準に準ずるべきである。ことにアガロースゲルブロック中の細胞からDNAを抽出する処理行程はEppendorfチューブの開閉回数が多く、周囲への汚染のリスクはかなり高い。O157：H7、結核菌をはじめとして、多剤耐性化傾向にある細菌や治療法の確立していない細菌を取り扱う際には、さらに細心の注意を要求される（種によってはP3を使用）。proteinase K処理が済んだところで、Eppendorfチューブを新しい物と交換すると汚染のリスクは軽減出来る。通常はこの段階までは感染力ありとして取り扱って欲しい。芽胞形成菌・真菌・抗酸菌に関しては、最後まで気を抜かない方がよい。著者は念のため、新菌種に挑むときには、どこまで生菌が残存するのか、コントロールスタディーを行う事にしている。結核菌に関しては、バイオラッド社では現在GenePathの結核菌用キットを開発中で、開発者によると汚染対策に関するガイドライン策定にはいま暫くかかるとのことである。必要に応じて、ディスポ器材のオートクレイブ処理や、機器の80%エタノールまたは次亜塩素酸処理を行う。

作業効率の改善

現在のところ、PFGE-RFLPs解析の殆どの行程が用手法に頼っている。このため、1日に作業可能な検体数は自ずと決まってくる。汚染を最小限にとどめるためにも菌液濃度の調整は、キュベットでなくディスポーザブルの試験管で直接菌液濃度が測定可能なタイプの分光光度計を用いると簡便でよい。MacFaland指数に応じた標準液（ATCCの菌株のカタログに定義が記載されている）を置き、対比して菌液濃度の指標とすると良い。小型のサンプルゲルブロックの操作は、検体がアガロースなので、細心の注意が必要となり、作業効率を悪くする。サンプルゲルブロックの洗浄器が商品化されるまで、当分この悩みはつきない。作業効率に関しては、大いに問題を感じるので、今後の技術革新に期待したい。

サンプルプラグをウエルに充填する際に、失敗しないためのtipsを紹介しよう。通常サンプルはコームで作成したウエルに後から充填するが、挿入時にプラグが曲がったり折れたりするのでこれを避けるために、予めコームにプラグを付着させ、溶解しているアガロースを糊代わりに用いて周囲を固定しておき、そのコームを立てて、この状態でアガロースをゲルトレイに充填してしまう。こうすると、コームを引き抜くと、サンプルプラグは電気泳動用のアガロース側に固着し、ウエルのみ作成されることとなる。このウエルはアガロースで単純に充填しておけばよい（図1.参照）。

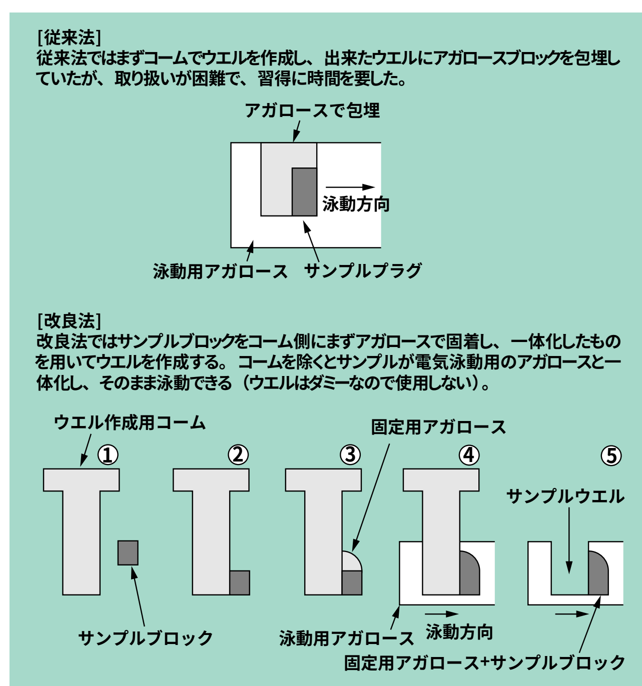


図1. 改良用サンプルプラグ包埋法

多型性解析に使用する制限酵素の至適化

特定の菌種において、どの制限酵素がいかに効率よく多型解析に応用できるかが一つの課題である。この基礎検討には、膨大なデーターの蓄積のための労力とコストを必要とする。特定の菌種に、ある酵素を用いると多型性があることが報告されると、その程度に関わらず、他の研究者たちが後追いするように同一の酵素を用いて報告し始める傾向がある。例えば特定の菌種を1,000株調べても、ある酵素で殆ど多型性がなく、ある酵素では20程度、ある酵素では600の多型性がみられたりと、制限酵素の認識部位と多型性ならびに変異度に関連して変化に富む。疫学的目的の多型解析では、多型性の頻度の明らかになっている制限酵素を用いて比較検討する必要があるのだ。このような地道な基礎データーとりの作業は是非、菌株保存施設の研究者に提供してもらわなければならない。しかし、データーの過信は禁物である。PFGE-RFLPsはあくまでも全塩基配列データーが簡便に比較できるようになるまでの報告では不十分と感じる菌種に対しては、まず、自らが検討する必要がある。

分子量マーカーの意味付け

現在国内の多くの研究者は分子量マーカーとして、50Kb DNAラダーなどのコマーシャルベースの分子量マーカーを選択しているものと拝察する。ここに問題点が1つある。通常のミニゲル電気泳動と異なり、PFGE-RFLPsでは解析の対象とするDNA断片がkb〜Mbのオーダーと大きいので、菌種によってはA・T・G・Cの各組成に偏りが見られる。集合体としてのDNA制限酵素切断断片としてみたとき、質量はこのような既存の分子量マーカーが正確に情報を伝えているのかどうなのかということが問われる。現在CDCでは米国バイオラッド社と共同で、各菌種毎に特定のAmerican Type Culture Collection（ATCC）株のGenomic DNAを特定の制限酵素で切断したものをマーカーとして使用する試みを行っている。将来的にCDCスタンダードとして各菌種毎に推賞される分子量マーカーが登場するかも知れない。現状で可能なのはGenePathシステムのスタンダードモジュールに梱包されているATCC株がその目的で採用される可能性が高いので、これらも同時に処理して泳動しておくことをお薦めする。

解析画像のデーター処理

PFGEの済んだアガロースゲルは、EtBr染色を行った後画像解析のために、カメラに画像を取り込むが、システムによっては直接ポラロイドの様なアナログ画像に取り込むよりは、イメージを直接デジタル化しておいた方が、最終的に得られる情報量が多くなる。即ち、写真フィルムのラチュードよりもデジタル情報の方が、系統樹作成ソフトウエアで解析する際に、有利なことが多いのである。この分野もコンピューターの低価格化に伴い、コストはまだ高いが、製品の実用性は十分である。系統樹作成ソフトウエアのアルゴリズムには現在数種類あり、これらの何れを用いても、だれもその正当性を科学的に証明出来ているわけではない。あくまでも一定の数式（理論式）にあてはめて仮定しているのみで、この点から、そのデーターはあくまで参考に過ぎない。視覚的にデーターを変換するので、プレゼンテーションには向いているが、解析結果は将来的に再評価が必要である。たとえば、ある時、ファージが感染してその遺伝子の一部が、菌の染色体DNAに取り込まれたとする。すると、挿入部位を含むのフラグメントは、肥大化し、極端に、分子量の変化を来しうるのである。このような変化は実験的には証明されているが、現在のソフトウエアはその理由付けまでは推論してくれないのである。CDCから細菌のPFGE-RFLPs解析の暫定案が示されているがこちらも基準が曖昧である[4]。その他基本的なテクニックは文献を参考にして欲しい[5]。

著者ホームページは "http://163.212.126.148/MolEpidemiol.html" である。

(1) T. Mitsuda, K. Arai, S. Fujita, and S. Yokota. *Journal of Hospital Infection*, **31**, 123-134, 1995

(2) T. Mitsuda, T. Muto, M. Yamada, K. Kobayashi, M. Toba, Y. Aihara, A. Ito and S. Yokota. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 652-656, 1998

(3) R. Puohiniemi, T. Heiskanen, A. Siitonen. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**, 2487-2491, 1997

(4) F.C. Tenover, R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E.Murray, D.H.Persing and B.Swaminathan. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 2233-2239, 1995

(5) 満田年宏、荒井一二、川本 進、横田俊平. 日本細菌学会誌, **50**, 1077-1086, 1995

D Codeシステムを用いたミューテーション解析について

日本バイオ･ラッド ラボラトリーズ㈱ ライフサイエンス事業部　プロダクトサポート

1. はじめに

分子生物学の分野においてミューテーションを検出することは非常に重要な意味を持つ。遺伝子の欠失、挿入、塩基置換等のスクリーニングにはこれまでサザンブロッティング等が用いられてきたが、近年、DNAのミューテーションを検出するために多くの手法が開発された。これまで使用されてきた最も一般的な手法としてはSingle-Strand Conformational Polymorphism(SSCP)、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)、Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) などがあげられる。そしてまた、これらの手法はミューテーション検出だけでなくDNA多型の解析にも用いられている。ここではこれらの手法の原理、特長についてDCodeミューテーション検出システムを用いたデータを含めて紹介する。

2. 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 DGGE/CDGE法

(DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis、
CDGE: Constant Denaturant Gel Electrophoresis)

A. 原理

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法DGGE はDNA断片中の1塩基の違いを検出する際非常に有効な手法である。DGGE法による分離はFisherとLerman[(1)]によって発表された。変性剤濃度勾配ゲルの変性剤濃度に応じて２本鎖DNAは“メルティングドメイン”ごとに解離していく。これらの“メルティングドメイン”にはそれぞれ塩基配列に依存した解離温度(Tm値)を持ち、それらは塩基配列が異なればTm値も異なる。DNA鎖は、低いTm値を持ったメルティングドメインからその解離条件(変性剤濃度)に達すると部分解離していく。部分解離したDNA鎖はポリアクリルアミドゲル中での移動度が非常に小さくなる。つまり、塩基配列の違いが移動度の差となりmutant typeとwild typeの分離が可能となる。これにより99%にのぼる検出効率が得られる。(図1)

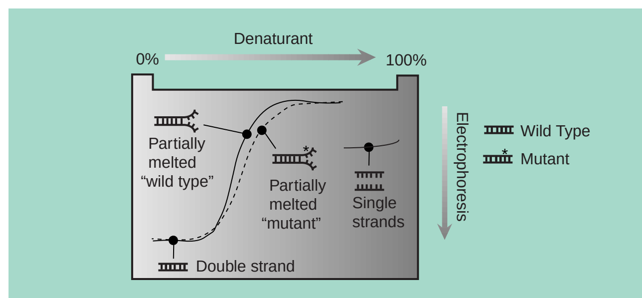


図1. 垂直DGGE

B. ゲル

DGGE：尿素とホルムアミドのリニア変性剤濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを使用する。7M尿素、40%ホルムアミドが100%変性剤濃度となる。変性剤濃度勾配は泳動方向に対して垂直方向又は平行方向が用いられる。垂直ゲルを使用した場合、通常、0-100%または20-70%といったような範囲で変性剤濃度勾配が用いられる。それに対して平行DGGEでは変性剤濃度勾配は泳動方向に対して平行に濃度勾配が作製される。

CDGE：尿素とホルムアミドの均一変性剤濃度ポリアクリルアミドゲル。変性剤濃度はDGGEによって決定する。

C. 泳動温度

一般にDGGEは50-65℃の一定温度で行なう。DNAは変性剤濃度と泳動温度との相互関係によって変性する。

D. サンプル

DNAサンプルはPCRによって増幅する。PCRの際、GCクランプという40bp程度のGC richな配列をサンプルに付加させることにより、高い検出効率が得られる。[(2)(3)]

垂直DGGEの場合は、mutant typeとwild typeのDNAを混合して泳動し、バンドが複数検出された場合ミューテーションがあると判断され、バンドが枝分かれをしている変性剤濃度のCDGEでスクリーニングを行なうことができる。

E. データ

β-グロブリン遺伝子のミューテーション検出を垂直DGGE、CDGEで行なった。

サンプル：wild typeと3種類IVS1-1、IVS1-6、IVS1-110の
mutant typeの計４種である。

4種のゲノムDNAからPCRによってGCクランプ(40bp)が付加された281bpのPCR産物を生成し、DGGE/CDGE法で解析した。

1) 垂直DGGEを用いて最適な変性剤濃度を決定する。

7.5cmx10cm、1mm厚、8%アクリルアミド/ビス(37.5:1)ゲル、20-70%変性剤グラジェント、1xTBE、130V、3時間、56℃にて泳動を行なった。(図2)

このように泳動方向に対して垂直の変性剤濃度勾配ゲルによって濃度による移動度が連続的に確認できるため、DNAの移動度の差が大きく見られる変性剤濃度が簡単に決定できる。これにより次の多検体スクリーニング(CDGE法)の条件設定を容易にする。

2)20-70%の垂直ゲルにおいてほぼ45%付近でバンドが枝

分かれしている。このように移動度の差が最も大きく、枝分かれしている部分の濃度を決定し、変性剤濃度が均一なCDGEゲルを作製、スクリーニングを行なった。(図3)

結果

このように垂直ゲルによって決定した均一変性剤濃度ゲルによってHomoduplex、Heteroduplexの4種のサンプルを区別することが可能であり、効果的な多検体のスクリーニングが可能となる。

詳細はBulletin2107をご請求下さい。

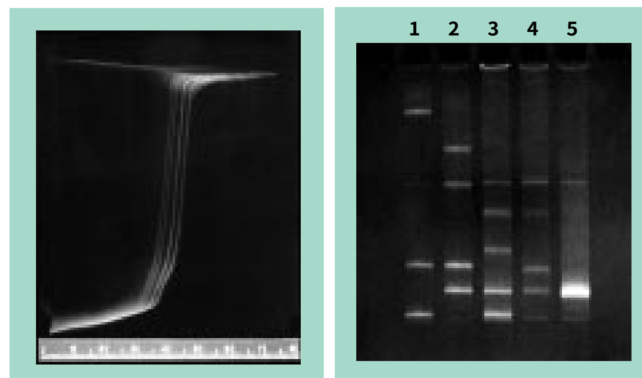


図2. Perpendicular DGGE separation of β-thalassemia mutant IVS1-6 run on the DCode system. The optimum denaturant concentration to use in a CDGE gel was determined at the location where the maximum split occurs between the heterozygous and homozygous alleles.

図3. CDGE separation of β-thalassemia samples run on the DCode system. Lane 1, compound mutant sample IVS1-1 + IVA1-6; lane 2, mutant sample IVS1-1; lane 3, mutant sample IVS1-6; lane 4, mutant sample IVS1-110; lane 5, wild-type DNA.

3. 温度勾配ゲル電気泳動法TTGE

(Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

A. 原理

TTGEは、原理的にはDGGE法と同様DNAが部分解離し、移動度が著しく小さくなることによって塩基配列の違いを解析する手法である。化学的な変性剤濃度勾配を使用することなく温度を上昇させることによって変性させる。ターゲットとなる遺伝子から増幅されたMutant typeとWild Typeは 均一の変性ゲルで泳動される。泳動中、温度の勾配(Ramp Rate)は 直線的にゲル全体の温度を上昇させる。このように、ゲル中の尿素と温度上昇との組み合わせにより、変性状態が形成されていく。変性剤濃度勾配を作製しないため、迅速に多検体のスクリーニングが可能となる。

B. ゲル

尿素を含む均一のポリアクリルアミドゲル。ゲルに尿素を加えることにより、泳動温度を低下させる。尿素変性ゲルはDNAの解離温度を1Mあたり2℃低下させるといわれている。(5)(6)

C. 泳動温度

TTGEゲルは40-70℃の範囲で泳動する。

MacMeltソフトウェアを用いて塩基配列メルティングプロファイルを求めることによって泳動開始温度と泳動時間、泳動温度の上昇率を決定する。

泳動条件の決定

MacMeltソフトウェアの値はTm値を算出するソフトウェアである。メルティングプロファイルの値を直接用いて泳動温度を決定することが可能である。泳動温度のRamp Rateの範囲は、GCクランプのついていないDNA配列の一番高いTm値と低いTm値をメルティングプロファイルから求め、それをもとに算出する。(図4)

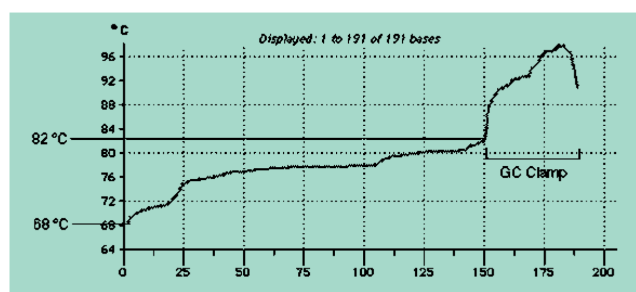


図4.

最低温度と最高温度より求められた理論上の解離温度はゲル中に尿素を加えることにより下げることが可能である。

図4.ではDNA塩基配列の理論上の解離温度範囲は68-82℃となっている。しかし、7M尿素のゲルを用いることにより泳動温度は54-68℃となる。

D. サンプル

DGGE法同様、高い検出効率を確保するために30-40bpのGCクランプをプライマーの一端につけたPCR産物を使用する。

E. データ

cystic fibroblast遺伝子のexon10(369bp)及びexon11(289bp)の14種類のPCR産物をTTGEにて解析した。PCR産物にはそれぞれ40bpのGCクランプが付加されている。(サンプルはDr.L.Silverman, University of North Carolina School of Medicineより提供して頂いた)

16x16 cm、1mm厚、6M Urea/6%アクリルアミド/ビス(37.5 : 1)、1.25xTAEバッファーにて泳動。

PCR産物はそれぞれ200-300ngとなるように5μlの2x色素溶液 (70% Glycerol、0.05%BPB、XC、2mM EDTA)と混合しアプライした。

泳動条件：130V、5時間、50-60℃ (温度Ramp Rateは2℃/hour)、DCodeシステム使用

泳動後EtBrにて染色し、脱色した後、ゲルドキュメンテーションシステムGel Doc1000にて撮影。(図5)

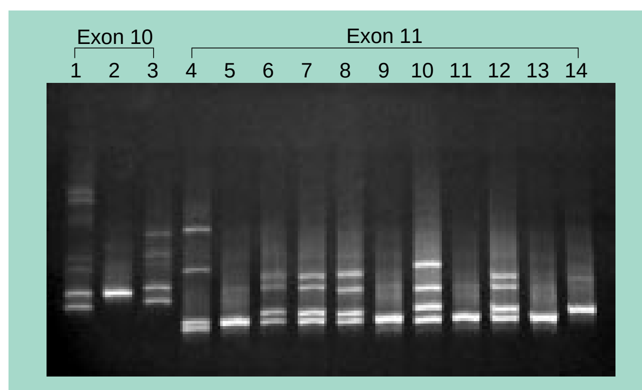


図5. Separation of amplified mutant and wild-type alleles of exons 10 and 11from the cystic fibrosis gene on the Dcode system. Lane 1, mutant allele (ΔF508); Lane 2, wild-type allele; Lane 3, mutant allele (V520F); Lane 4, mutant allele (R560T); Lane 5, 9, 11, 13, wild-type allele; lane 6, exon 11 mutant allele (1717-1G-A); lane 7, mutant allele (G551S); lane 8, mutant allele (G542X); lane 10, mutant allele (R553X); lane 12, mutant allele (G551D); lane 14, mutant allele (S549N).

結果及び考察

TTGEを行なうにあたっての泳動温度、及びRamp RateはMacMeltソフトウェアにて行なった。TTGE法により、14サンプルから、exon10から2種のミュータント、exon11から7種のミュータントが検出された。レーン2、5、9、11、13がwild typeである。

このようにTTGE法はミューテーションのスクリーニングに有効な方法である。また、DCodeは正確な温度管理の必要なTTGE法を再現性良く行なう事が可能である。

なお、詳細についてはBulletin2103をご請求下さい。

4. 一本鎖DNA高次構造多型SSCP
(Single-Strand Conformational Polymorphisms)

A. 原理

一本鎖DNAは塩基配列に依存した高次構造をとるため、塩基配列の違いがその構造の差となり移動度の差として検出される。wild typeとmutant typeの二本鎖DNAはまず一本鎖に解離され、その後泳動する。1本鎖DNAは塩基配列に依存した高次構造をとり、サンプルの移動度の差によってミューテーションの有無が検出される。SSCPはその簡便さゆえに広くミューテーションスクリーニングに用いられている手法である。しかしながら、サンプルのミューテーションに応じた泳動条件は経験的に決定されなければならなく、適切な泳動条件の決定は非常に重要となる。

B. ゲル

SSCPでは変性剤の含まないポリアクリルアミドゲルが用いられる。サンプルによっては5-10%のグリセロールを加えることによって効果的に移動度の差を検出できる場合がある。また、架橋度も検出に影響するファクターの1つとなる。SSCPでは1-2%の架橋度が多く使用される。

C. 泳動温度

4-25℃の泳動温度でミューテーションによる移動度の差を検出する。最適な泳動温度は経験的に決定される。

D. サンプル

SSCPのサンプルはPCR産物を熱変性をさせ、一本鎖にしたものを用いる。

E. データ

サンプルはβ-グロブリン遺伝子のwild typeとmutant typeの2種類である。

293bpのPCR産物は同量の2xSSCPサンプルバッファー(95% ホルムアミド、0.05%BPB、XC、20mM EDTA)と混合し、95℃で5分の熱処理をした後、氷冷し、泳動した。

ゲル：16x20cm、0.75mm厚、8%アクリルアミド/ビス(37.5:1)、7%グリセロール、1xTBE

バッファーは外付けの冷却循環装置をDCodeシステムに取付け、8℃で泳動を行なった。

泳動条件：30w定電力。

結果

最適な泳動条件を用いることによりmutant typeの検出が可能である。(図6)

詳細についてはBulletin 2104をご請求下さい。

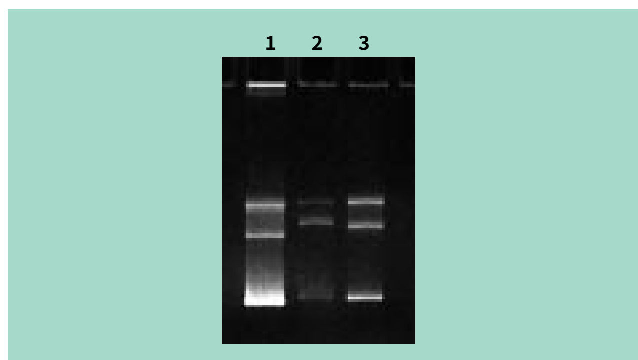


図5. SSCP samples run at 8˚C on the DCode system. Lane 1, heterozygouz mutant IVS1-6; lane 2, wild-type; lane 3, homozygous mutant β-sickle.

5. まとめ

PCR法の普及や、検出用の染色剤の発展によってミューテーションの検出やDNA多型の解析が短時間、且つ安全(non RI)になり、様々なミューテーション検出、スクリーニングの手法が開発された。その中でも簡便なSSCP、検出効率の高いDGGE、TTGE法についてDCodeシステムを用いた解析データを紹介した。

ミューテーション検出するには、手法を変更する、もしくは複数の手法を組み合わせて行なうことが効果的な

場合がある。DCodeシステムは、同一の装置において複数の手法を組み合わせたり、手法を変更、追加することが可能な経済的な装置であるため、今後のミューテーション検出に大きく貢献すると考えられる。

参考文献

(1) Fisher, S. And Lerman, L., *Proc. Natl. Acad. SDI.*, **80**, 1579-1583 (1986)

(2) Myers, R., Fisher, S., Lerman, L., and Maniatis, T., *Nucl. Acids, Res.*, **13**, 3131-3145 (1985)

(3) Costes, B., Girodon, E., Ghanem, N., Chassignol, M., *Hum. Mol, Genet.*, **2**, 393-397 (1993)

(4) Lerman, L. S. and SilverStein **K.**, *Methods Enzymol.*, **155**, 482-501 (1987)

(5) Gelfi, C., Righetti, P., Cremonesi, L., and Ferrari, M., *Electrophresis*, **15**, 1506-1511 (1994)

(6) Steger, G., *Nucleic Acids. Res*, **22**, 2760-2768 (1994)

キャピラリー電気泳動装置「バイオフォーカス」 2波長レーザー誘導蛍光検出器 LIF² Detector

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ㈱ ライフサイエンス事業部 **手塚静雄**

バイオ・ラッドでは昨年秋にキャピラリー電気泳動装置用の蛍光検出器『2波長レーザー誘導蛍光検出器』：Bio-Focus LIF² Detectorを発売いたしました。今回はご好評頂いている本装置の優れた性能と、実際の分析例をご紹介いたします。

2波長レーザー誘導蛍光検出器の特徴

(1) キャピラリー電気泳動の為に考案された独特の検出系
(2) 2種類の蛍光を同時に測定可能
(3) 光電子増倍管(PMT)を使用しているので最高の感度を実現
(4) UV/VISとの切替えがワンタッチで

キャピラリーのための検出系

すべての蛍光光度計は励起光と受光部は必ず垂直方向になるように設定されています。これは通常の分光光度計の場合と異なり、励起光により発生する蛍光は励起光に関係なくすべての方向に放出されます。このため、励起光の影響を最も受け難い垂直方向でその強度を測定することが最も望ましいからです。(図1.)

通常の蛍光光度計では角セルを使用していますが、キャピラリー電気泳動ではセルの形状は方形ではなく円形をしています。このため、蛍光光度計と同じ構造にした場合、励起光の散乱が検出に大きな影響を与えてしまいます。

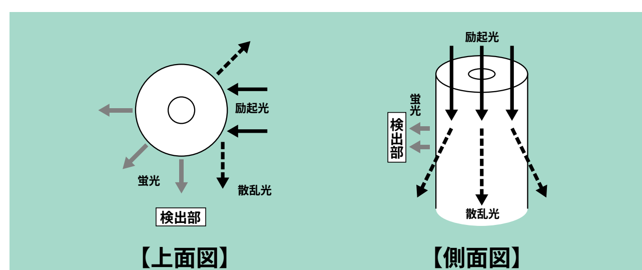


図1.

バイオフォーカスの蛍光検出器では、励起光を真横からではなく、斜め上方からキャピラリーカラムにあてることにより、受光部での散乱光の影響を最小限に抑えることが出来ました。

理想的な光学計の完成により、SYBR-GIを用いたDNA分析において4ゼプトモルという今までにない検出感度を実現いたしました。(ゼプトモル＝Zepto mol = 10^{-21}mol)

2種類の蛍光を同時測定

2波長レーザー誘導蛍光検出器 LIF² DFetectorの検出部の構造を図2.に示しました。

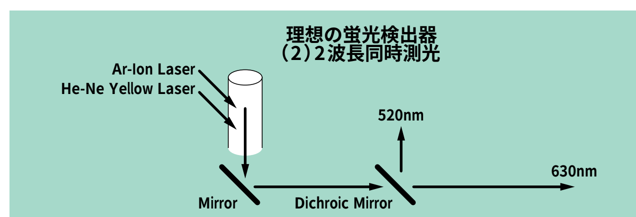


図2.

2本の光ファイバーで誘導された2つの励起光は上記のような理想的な光学計により、キャピラリーカラム検出部に同時に照射されます。得られた蛍光はDichroic Mirrorにより短波長側と長波長側に分けられ、フィルターを経て、それぞれのフォトマルで検出されます。照射するレーザー光も2つ同時に使うことも可能ですが、どちらか片方のみを使うことも可能です。

光電子増倍管(PMT)を使用しているので最高の感度を実現

キャピラリー電気泳動に使用されている蛍光検出器には得られた蛍光を光電子増倍管（フォトマルチプライヤー）で検出する方法とCCDを用いて検出する方法の2種類が採用されています。感度において、CCDタイプに比べてPMTがはるかにすぐれていることはすでにご承知のことと思います。

UV/VISとの切替えがワンタッチで

UV/VISから蛍光検出器に切り替える際にもワンタッチで切替えが可能です。だれでも簡単に行える構造になっております。但し、交換の度に光軸のずれによって検出感度に差が出るようでは仕方ありません。本装置では、キャピラリーカラムの測光部に励起光が常に正しく照射されるよう、簡単にアラインメントを調整できる機構をそなえています。

蛍光測定例

検出感度

蛍光色素としてSYBR-GIを用いて、100bp - 1000bpまでのラダーを測定したものを図3.と図4.に示しました。いずれも500bpを基準にして計算しておりますが、図3.では63ゼプトモル（サンプル濃度で2.5pg/μl)のDNAを検出しています。未だベースラインは安定しております。図4.ではDNAの濃度が4.2ゼプトモル（サンプル濃度で0.17pg/μl)のDNAを検出できました。

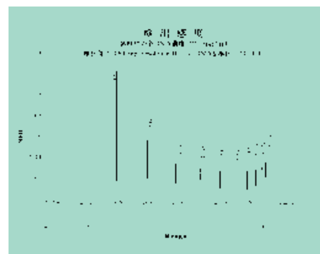


図3.

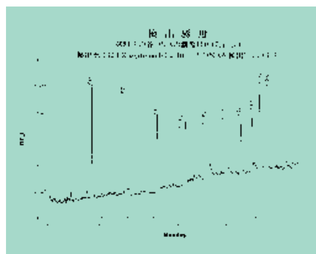


図4.

【分析条件】
（使用キャピラリー）24cm×75μmIID×375OD, AAEE coated
（印可電圧）2.5kV、（分析温度）40°C、（分析時間）15分、
（泳動バッファー）CE dsDNA Run Buffer

他社製DNAスタンダードの分離例

アガロースゲル電気泳動による分離パターンでは、図5.中の140bpと151bpや413bpと417bpと427bp及び713bpと726bpのそれぞれがシングルバンドで確認されますが、バイオフォーカスでの分離ではこれらすべてが分離できています。

また同様に、図6.でも110bpと111bpおよび489bpと501bpが分離できました。

分析条件は上述のDNAスタンダードと同一条件の24cmのキャピラリーで行なっております。

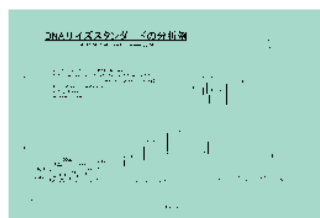


図5.



図6.

遺伝子解析に関してはすでにバイオフォーカスを用いた紫外部吸収法での報告がされていますが、2波長が同時に測定できるため、測定間誤差を考慮する必要がありません。従って、対象サンプルとの比較が極めて正確に行えます。図7.にRFLP解析の実例を示しました。

バイオフォーカスでは『ポストインジェクションモード』（対象サンプルを注入後、比較用サンプルを自動注入する方法）が使えますので、サンプルに比較用サンプルを入れておく必要はありません。

糖及び糖鎖解析

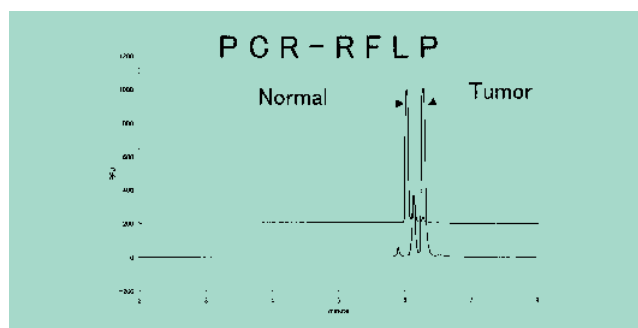


図7.

キャピラリー電気泳動での糖解析には紫外部吸収法と蛍光検出法が報告されております。いずれもPA化等の方法で修飾することにより分析が可能となりますが、最近では測定感度の点から蛍光検出による事例が殆どです。図8.にAPTSでラベルした糖スタンダードの分析例を示しました。

糖精製物の純度評価から生体細胞表面の糖鎖解析に応用範囲が広がってきており、この意味でもより感度の高い検出装置が必要になってきております。

その他

最近ではポリアクリルアミドゲル電気泳動などでSYPRO OrangeやSYPRO Redなどを用いたタンパク質の蛍光検出が広く応用されるようになってまいりました。この他にも種々の蛍光試薬が発売されておりこの分野の応用はさらに広がっていくものと思われます。

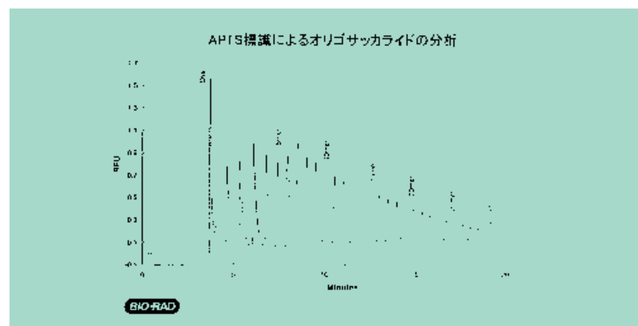


図8.

ホールゲルエリューターによるPAGEゲルからのサンプル回収

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ㈱ ライフサイエンス事業部

ホールゲルエリューターは、PAGEゲルで分離されたサンプルを電気的に溶出し、回収するシステムである。従来法のように、ゲルからのバンドの切り出しは必要なく、簡単、迅速に回収できるため、スクリーニング、精製に有効である。

原理と構造

ホールゲルエリューターは、PAGEゲルで分離された複数のサンプルバンドを一度に、ゲルを切り出すことなく、溶出・回収することが可能である。

図1.は、溶出中の断面図である。

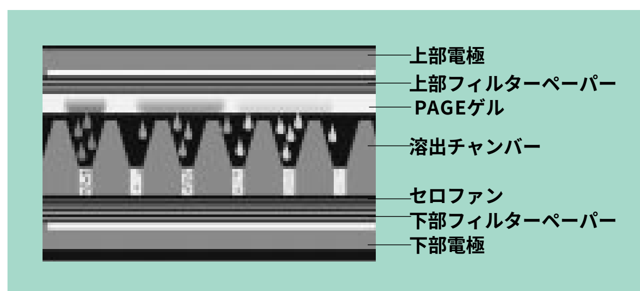


図1.

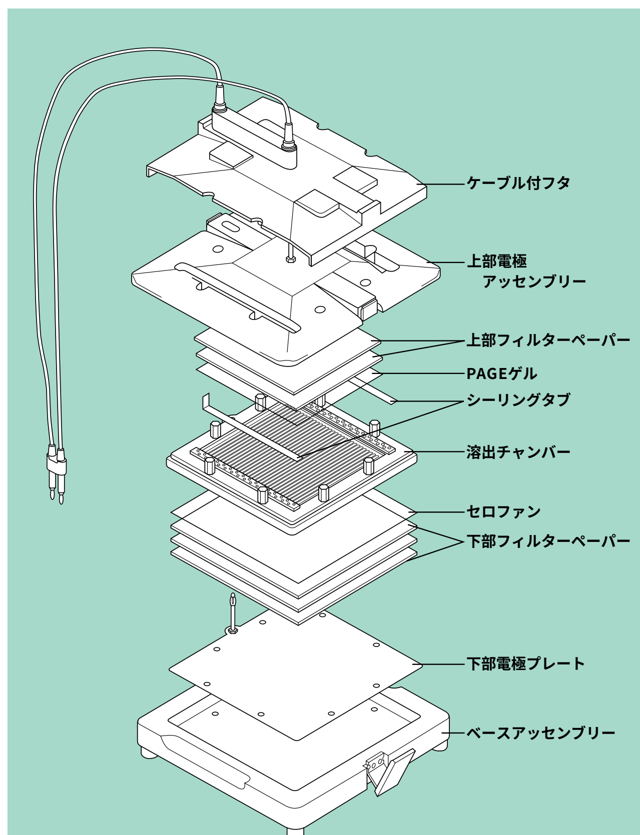


図2.

ゲル中のサンプルは、下部電極へ向かって電気的に溶出され、溶出チャンバーの各チャンネル内に保持される。ミニホールゲルエリューターは14、ホールゲルエリューターは30の分画に溶出・回収される。

セロファンは、溶出されたサンプルが下部フィルターペーパーへ流出することを防ぐ。また、低分子量の物質はセロファンを通り抜けてしまうため、SDS-PAGE後のサンプルから、溶出と同時にSDSの除去を行うことが可能である。

ホールゲルエリューターの構造、操作方法は、図2.と下記に示す通りである。

1. 溶出バッファーに浸した下部フィルターペーパーとセロファンを重ねて本体にセットする。
2. その上に、溶出チャンバーをセットし、ネジをしっかり締め、チャンバー内にバッファーを満たす。
3. 電気泳動後のゲルをテンプレートに合わせてカットする。
4. 溶出チャンバーの上にゲルを重ね、さらに溶出バッファーで浸した上部フィルターペーパーを重ねる。
5. 過剰バッファーを拭き取り、ハーベストポートをシールする。
6. 上部電極、フタをセットし、通電を行う。
7. フタをはずし、シールを取り外してから、ハーベストボックス、またはピペット等で回収を行う。

※資料：Bulletin 2043, 2216

参考文献

Anderson, P. and Heron, I., Simultaneous electroelution of whole SDS-polyacrylamide gels for the direct cellular analysis of complex protein mixtures, *Journal of Immunological Methods*, **161**, 29-39, 1993

ホールゲルエリューター Q&A

Q. ゲルの大きさはどれくらいのものが使用できるのか？
A. ミニホールゲルエリューターでは、6.5×5.5（L×W）cm以上、ホールゲルエリューターでは、14×16（L×W）cm以上のゲルが使用可能である。また、ゲル厚は3mmまで使用可能である。

Q. 溶出チャンバーのチャンネル（溝）にバンドを合わせて溶出したいので、溶出前にバンドの確認をしたいが、どのようにしたらよいか？CBB染色後のゲルからの溶出は可能か？
A.
・回収したいサンプルの分子量があらかじめわかっている場合は、着色済みのスタンダードを流してそのバンドを目安にする。
・ネガティブ染色剤（弊社Zinc Stain Kit、Copper Stain Kit）を利用する。タンパクを染色せずに、バックグラウンドを染色するため、タンパクバンドに影響を与えずにバンドの確認が可能である。染色後は完全に脱色してから溶出する。
・CBB染色後のゲルでは、サンプルが固定されているため、溶出しにくい。ホールゲルエリューターでの効率の良い回収は期待できない。

Q. 回収率はどれくらいか？
A. 平均70%以上という報告がある。通電時間、溶出バッファー、サンプルの性質（分子量、pI等）、ゲル厚、ゲル濃度等の要因によっても回収率は変わる。

Q. 溶出バッファーは何を選択すればいいのか？
A. サンプルが溶出しやすいような条件（マイナスチャージ）になるように溶出バッファーを選択する。特にNative-PAGEゲルからの溶出では、目的タンパクのpIに基づき、タンパクのマイナスチャージができるだけ大きくなるようなpHの溶出バッファーを選択する。取扱説明書にはpH3.8～10.2までのMcLellanのバッファー系を紹介している。（表1.）
SDS-PAGEゲルからの溶出ではこのMcLellanのバッファーのpH9.4、10.2のバッファーで回収率が向上するとの報告がある。また、溶出バッファーにSDSを含まないものを用いれば、SDS含バッファー中のサンプルをSDSを含まないバッファーに置換することが可能である（SDSはセロファンを通り抜けてしまうため）。SDSは溶出バッファーに含まれている方が溶出しやすいが、溶出後アッセイに用いる場合には、阻害剤となってしまうことがある。前記のMcLellanのバッファーにはSDSは含まれない。

Q. サンプルの回収率が悪い。
A. 通電後のゲル、セロファンを染色してタンパク質バンドを確認する。
・ゲルからは溶出されているが回収率が悪いという場合は、セロファンにサンプルが付着している可能性がある。通電後、パワーサプライに差し込んであるプラグを＋－逆にして数十秒間逆通電を行うと、付着してしまったサンプルが回収しやすくなる。また、溶出バッファーに界面活性剤が含まれている場合は付着しにくい。
通電時間が長すぎる、通電後放置しておくなどの原因でもセロファンに付着して回収しづらくなることがある。
・ゲルからの溶出が充分でない場合は、溶出条件の検討が必要だと思われる。
通電時間が足りない、溶出バッファーが不適当である、電極間に気泡が入っている等の原因が考えられる。ゲル厚、ゲル濃度、サンプルの分子量や等電点、バッファーのpH等は回収率に影響を与えるため、これらに合った条件設定が必要である。また、セッティング時に気泡が入らないよう十分注意する。

表1. McLellanのバッファー系

バッファーpH	塩基	酸
3.8	30mM β-アラニン	20mM乳酸
4.4	80mM β-アラニン	40mM酢酸
4.8	80mM GABA	20mM酢酸
6.1	30mMヒスチジン	30mM MES
6.6	25mMヒスチジン	30mM MOPS
7.4	43mMイミダゾール	35mM HEPES
8.1	32mMトリス	30mM EPPS
8.7	50mMトリス	25mMホウ酸
9.4	60mMトリス	40mM CAPS
10.2	37mMアンモニア	20mM CAPS



BIO-RAD 日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

ライフサイエンス事業部
本社 〒116-0014 東京都荒川区東日暮里5-7-18 コスモパークビル (03)5811-6270 FAX.(03)5811-6272
神奈川営業所 〒222-0033 神奈川県横浜市港北区新横浜2-7-3 フジビル (045)476-0351 FAX.(045)476-0350
つくば営業所 〒305-0031 つくば市吾妻1-15-1 筑波司法会館 (0298)52-0835 FAX.(0298)52-0829
大阪営業所 〒532-0025 大阪市淀川区新北野1-14-11 第一生命ビル (06) 308-6568 FAX.(06) 308-3064
名古屋営業所 〒465-0093 名古屋市名東区一社3-121-1 MIDORIビル (052)702-2358 FAX.(052)702-2812
福岡営業所 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東2-17-5 モリメンビル (092)475-4856 FAX.(092)475-4858
※技術的お問い合わせは (03)5811-6271 FAX.(03)5811-6272